PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68, C07K 1/04

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/15893**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06001

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1998 (21.09.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 41 716.7 22. September 1997 (22.09.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D–65926 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: MICULKA, Christian [AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D–65929 Frankfurt am Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D–65795 Hattersheim (DE). HOPPE, Hans–Ulrich [DE/DE]; Amselweg 11, D–65929 Frankfurt am Main (DE).

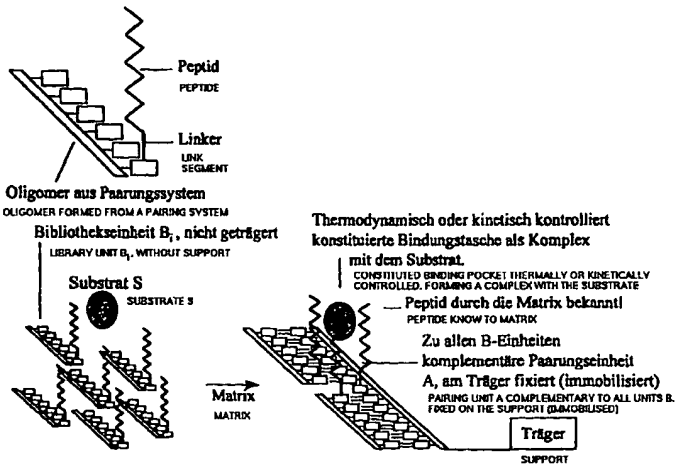
(74) Anwälte: BARDEHLE, Heinz usw.; Galileiplatz 1, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: ADDRESSABLE MODULAR RECOGNITION SYSTEM, PRODUCTION MODE AND USE

(54) Bezeichnung: ADRESSIERBARES MODULARES ERKENNUNGSSYSTEM, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) Abstract

The invention concerns a recognition system comprising (a) at least an immobilised binding constituent A and at least a binding site for the recognising species B and (b) at least a recognising species B capable of being fixed on the constituent A and at least a binding site for a substrate S, the binding of constituent A on the recognition species B intervening in the form of a molecular pairing system.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennzungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Adressierbares modulares Erkennungssystem, seine Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend

(a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspeziess B und

(b) mindestens eine Erkennungsspeziess B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält. wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspezien. die speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., Nature 1993, 364. 555) und Nucleinsäure-Arrays (Southern et al. Genomics 1992. 13, 1008; U.S. Patent Nr. 5,632,957).

In der experimentellen Analytik lassen Arrays durch die lokalisierte Erzeugung von Ereignissen eine besonders einfache. schnelle und reproduzierbare Datenanalyse zu. Beispiele hierfür reichen vom physikalischen Mehrkanaldetektor bis hin zu Mikrotiterplatten in der Labormedizin.

Arrays dienen auch zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen und sind das grundlegende Konstruktionselement der Nanotechnologie.

Weitere wichtige Anwendungsbereiche sind in der Biologie. Biochemie. Medizin und Pharmakologie zu finden. So wird in EP-A1-0 461 462 ein Immunoassay beschrieben, bei dem feldartig positionierte und immobilisierte Antigene mit einem oder mehreren Antikörpern in Kontakt gebracht werden. In WO 96/01836 wird beispielsweise ein Array von DNA-Molekülen unterschiedlicher Sequenz beschrieben. der zur Detektion von Genabschnitten diente und so beispielsweise zur Diagnose pathogener Bakterien führte.

Immobilisierung durch supramolekulare Wechselwirkungen sind auch außerhalb der Array-Anwendungen bekannt. So können Träger mit Anti-Antikörpern über ein kovalent an den Träger gebundenes Antigen fixiert werden. Die Analytik von Immunoassays basiert weitgehend auf Enzym-Immunoassays (EIAs), bei denen eine enzymatisch katalysierte Reaktion die Präsenz eines Antigen-Antikörper- oder eines Antigen-Antikörper-Antiantikörper-Komplexes anzeigt. Eine der am Komplex beteiligten Einheiten ist hierbei entweder an einem Träger immobilisiert oder selbst ein Träger, z.B. in Form von Gewebsbestandteilen.

Derartige Signalverstärkungsverfahren haben jedoch insbesondere bezüglich der Verläßlichkeit der qualitativen Aussage wie auch der Quantifizierung Nachteile. Ein besonderer Nachteil von miniaturisierten Arrays sind der Aufwand und die Kosten bei der Herstellung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Erkennungssystem zu finden, das einfach, zuverlässig, hochselektiv und zudem billig ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Erkennungssystem enthaltend
(a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
(b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

Solche Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht-kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversiblität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflußt werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch als „molekularer Klebstoff" für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11].

Daher ist es besonders vorteilhaft, wenn das Paarungssystem einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Erkennungsspezies B über nicht-

kovalente Wechselwirkungen gebildet wird. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen sind insbesondere Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen („Stacking"), Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen.

In einer besonderen Ausführungsform enthält das molekulare Paarungssystem gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nucleinsäure und deren Analoga, insbesondere in Form einer Pentose, vorzugsweise einer Pentopyranose oder Pentofuranose. Im allgemeinen ist die Pentose ausgewählt aus einer Ribose, Arabinose, Lyxose oder Xylose. Besonders bevorzugt ist Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure(CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen. Besonders bevorzugt sind Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) und vor allem p-RNA's.

p-NA's sind im allgemeinen zur natürlichen RNA isomere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorliegen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den Positionen C-2' und C-4' repetitiv verknüpft sind. Unter "Nucleobase" werden dabei die kanonischen Nucleobasen A, T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und 2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere Purine und Pyrimidine wie Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Isoguanin, 6-Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin, verstanden, und vorzugsweise Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguanosin, Ribopyranosylthymidin, Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyluracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)-ribopyranosyl]-Derivate.

p-NA's, und zwar die von der Ribose abgeleitete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (siehe Pitsch, S. et al. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2161; Pitsch, S. et al. Helv. Chim Acta 1995, 78, 1621; Angew. Chem. 1996, 108, 1619-1623). Sie bilden ausschließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d. h. Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende", quasi-lineare und stabile Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse

und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und läßt sich letzlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranoserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen.

Diese wesentlich besseren Paarungseigenschaften machen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die Anwendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungsystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's. was im besonderen im diagnostischen Bereich vorteilhaft ist.

p-NA's eignen sich daher besonders für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten. wie z. B. für den (kombinatorischen) Aufbau von Proteinassemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504], da p-NA's, und besonders p-RNA's Paarungssysteme bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt sich daher gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit, funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder DNA/RNA-Abschnitte, z. B. mit einem p-RNA-Code zu versehen. der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe z. B. WO93/20242).

Die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga ist gemäß der vorliegenden Erfindung mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15. vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide.

Im allgemeinen ist die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert.

Unter dem Begriff „immobilisiert" versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezien wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Poly-

saccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041).

Die Trägerung erfolgt somit im allgemeinen kovalent, quasi-kovalent, supramolekular oder physikalisch wie magnetisch (A. R. Shepard et al. (1997) Nucleic Acids Res., 25, 3183-3185, Nr. 15), im elektrischen Feld oder durch einen Molekularsieb. Die Bindungskomponente A wird hierdurch entweder direkt an der Position des Trägers synthetisiert oder an bestimmte Positionen des Trägers „gelinkt". Beispiele sind Konjugations- und Trägerverfahren über Perjodatoxidation und reduktiver Aminierung der Schiffbase, N-Hydroxisuccinimidester von vorzugsweise Dicarbonsäurelinker, Ethylendaminphosphoamidatlinker, Mercapto-, Jodacetyl- oder Maleinimido-Verfahren und/oder kovalente oder nicht-kovalente Biotin-Linker-Verfahren.

Unter dem Begriff „Träger" versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung Material, insbesondere Chipmaterial, das in fester oder auch gelartiger Form vorliegt. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

Eine besondere Ausführungsform ist daher ein erfindungsgemäßes Erkennungssystem, bei dem die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente Bindung oder supramolekulare Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezien wie linearkonstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, insbesondere in Form einer Matrix, immobilisiert, wobei die definierten Stellen des Trägers vorzugsweise adressiert sind.

Gemäß dem bevorzugten Erkennungssystem wird daher ein Molekül in der mobilen (Puffer)-Phase mit der entsprechenden Komplementärsequenz nur an der Position der passenden Adresse einen supramolekularen Komplex spontan ausbilden. Sind an diese mobile Komplementäradresse durch chemische (Konjugate) oder supramolekulare Verbindungsbildung (Komplexe) weitere Einheiten mit besonderen Funktionen wie z.B. der eines Antikörpers gebunden, wird je nach verwendeten Adressenmuster auf demselben Immobilisat-Array ein unterschiedlicher Funktionsarray aufgespannt.

Die großen Vorteile eines solchen modularen Systems sind die identische einmalige Bereitstellung der Trägereinheiten für unterschiedlichste Anwendungen und die *in situ* Erzeugung nicht- haltbarer Bio-Konjugate etwa aus Proteinen, Enzymen oder lebenden Zellen und dem Paarungsrest.

Ein weiterer Vorteil ist die schrittweise Erzeugung von Substratbindungsereignis und dem meßbaren Bindungsereignis an der Trägerposition, d. h. das Substrat kann völlig ungehindert einen ersten Komplex mit der löslichen, adressierten Komponente (Erkennungsspezies B) bilden und anschließend im Raum der Trägerposition paarend an die Bindungskomponente A immobilisieren.

Es ist ferner besonders bevorzugt, wenn die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist, da beispielsweise durch eine Signalverstärkung des Impedanzverhaltens von Träger-Elektroden bei Bindungsereignissen ein elektronisch lesbares Signal erzeugt wird. Entsprechende Elektrodenprozesse sind bei R. P. Andres (1996) Science, 272, 1323-1325 und entsprechende Impedanzmessungen sind bei M. Stelzle et al. (1993) J. of Physical Chem., 97, 2974-2981 beschrieben.

Als Erkennungsspezies B ist beispielsweise ein Biomolekül geeignet, welches z. B. ausgewählt ist aus einem Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragemente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.

Üblicherweise enthält das Biomolekül eine Binderegion für die Bindungskomponente A, die vorzugsweise eine der oben beschriebenen Nucleinsäuren oder deren Analoga darstellt. Im allgemeinen wird hierbei das Biomolekül an eine ausgewählte Nucleinsäure oder Analogon über einen Linker gebunden. Beispielsweise eignet sich ein Uracil-basierender Linker, bei dem vorzugsweise die 5-Position des Uracils modifiziert wurde, z. B. N-Phthaloylaminoethyluracil, aber auch ein Indol-basierender Linker, vorzugsweise Tryptaminderivate, wie z. B. N-Phthaloyltryptamin.

In einer besonderen Ausführungsform enthält die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Erkennungsspezien B, wodurch verschiedene Erkennungsspezien B an der Bindungskomponente A binden können.

In einer weiteren Ausführungsform ist mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert.

Daher ist ein weiteres erfindungsgemäßes Erkennungssystem dadurch gekennzeichnet, daß es
(a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens 2+n verschiedenen Bindestellen für mindestens 2+n verschiedene Erkennungsspezien B1, B2 ... Bn und eine weitere von der Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn verschiedene Erkennungsspezies B(n+3), die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und
(b) mindestens (n+3) verschiedene Erkennungsspezien B1, B2 ... B(n+3),
wobei n eine ganze Zahl von 0-20, vorzugsweise 0-10, insbesondere 0-5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.

In einer weiteren Ausgestaltung stammt die Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn aus einer Substanzbibliothek.

Zur Strukturanalyse eines Komplexes aus einer Substanzbibliothek ist es besonders vorteilhaft, wenn die Struktur der Erkennungsspezies B(n+3) bekannt ist, und/oder die verschiedenen Erkennungsspezien B dasselbe Substrat S erkennen.

Unter dem Begriff „Substrat" versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine nichtträgergebundene Substanz, die von dem erfindungsgemäßen Erkennungssystem erkannt wer-

den soll. Das Substrat S ist im allgemeinen ausgewählt aus Molekülen, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen, Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandanaloga, oder Peptide, Peptoide, Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragemente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate, oder Monomere wie Heterozyklen, insbesondere Stickstoffheterozyklen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren, Ester, Acetale oder Monomere wie Heterocyclen, Lipide, Steroide, oder Angriffsstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelrezeptoren, spannungs-abhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.

Substanzbibliotheken sind dem Fachmann aus dem Bereich der kombinatorischen Chemie bekannt. Beispiele sind die leicht zugänglichen Peptidbibliotheken, erzeugt durch Permutation der Peptidsequenz. Paaren solche Bibliotheken, entstehen völlig neue Supra-Moleküle bzw. Komplexe. Die beachtliche Anzahl möglicher Komplexe beinhaltet möglicherweise Erkennungsregionen für Substrat-Moleküle, ähnlich dem Epitop eines Antikörpers. Die Ausführungsform läßt dann ein Screening eines solchen stochastischen Bindungsereignisses zu. Ist eine der Konjugatbibliotheken an den Träger gebunden, kann durch die Codonadresse bzw. bei gleichbleibender Adresse durch seine bloße Position direkt seine Identität (z.B. die Peptidsequenz) festgelegt werden. Der Array erzeugt für einen der Paarungsstränge eine sogenannte codierte Bibliothek und vereinfacht die Komplexanalytik der supramolekularen Bibliothek.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt das erfindungsgemäße Erkennungssystem einen Immunoassay dar.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des erfindungsgemäßen Erkennungssystems, bei dem

(a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,

(b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und

(c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A, Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.

Insbesondere wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert.

Im allgemeinen wird der sich gebildete Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen, oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse, z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.

Besondere Amplifizierungs- oder Vorkonzentrierungsschritte der Substrate werden somit für viele Anwendungen nicht benötigt, was besonders vorteilhaft ist. Die chemische und physikalische Heterogenität der Positionen vor und nach den Paarungsereignissen kann zudem mit dem direktelektronischen Verfahren sehr vorteilhaft durch Parametrisierung bzw. Eichung über die Software eliminiert werden.

Das Problem, daß wichtige Substratmoleküle für solche Anwendungen Moleküle der natürlichen Paarungssysteme DNA und RNA selbst sein können und somit mit der Adressierung in störende Wechselwirkung treten würden, wird dadurch gelöst, daß besonders stabile, selektive und nicht-natürliche Paarungssysteme, wie z. B. p-NA's, verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf ein Verfahren, mit dem Erkennungsspecies, bevorzugt natürliche DNA- oder RNA-Stränge und Proteine, dabei

bevorzugt Antikörper oder funktionelle Teile von Antikörper. durch p-NA-Abschnitte. bevorzugt p-RNA-Abschnitte. eindeutig codiert werden. Diese können dann mit den zugehörigen Codons auf einem festen Träger hybridisiert werden. Damit kann auf einem festen Träger, der in Form eines Arrays mit Codons ausgestattet ist. nur durch Einstellung von Hybridisierungsbedingungen mit immer neuen Kombinationen von Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen immer neue. diagnostisch nützliche Arrays aufgebaut werden. Wird dann der Analyt, beispielsweise eine biologische Probe wie Serum o. ä. aufgebracht, dann werden die zu detektierenden Species in einem bestimmten Muster auf dem Array gebunden. welches dann indirekt (z. B. durch Fluoreszenzmarkierung der Erkennungsspecies) oder direkt (z. B. durch Impedanzmessung am Anknüpfungspunkt der Codons) registriert wird. Dann wird die Hybridisierung durch geeignete Bedingung aufgehoben (Temperatur. Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge), so daß wieder nur der Träger mit den Codons zurückbleibt. Dieser wird dann erneut mit anderen Erkennungsspecies beladen und wird z. B. für den gleichen Analyten für die Ermittlung eines anderen Musters verwendet. Die immer neue Anordnung von Erkennungsspecies im Array-Format und die Verwendung von p-NA's als Paarungssysteme ist gegenüber anderen Systemen. siehe z. B. WO 96/13522. besonders vorteilhaft.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S auch isoliert werden. Hierzu wird z. B. der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert.

Das erfindungsgemäße Erkennungssystem eignet sich folglich besonders gut zum Auffinden eines Substrates S. zur Diagnose. zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils. insbesondere zum Auffinden. zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Je nach den synthetisierten Adressen können somit für unterschiedliche Fragestellungen bzw. diagnostische Probleme schnell Kits zusammengestellt werden. die auf dem existierenden Codon-Array *in situ* das Testsystem durch Paarung bildet. Bevorzugt werden Biomoleküle. z. B. ganz allgemein Zell- oder Virus-Bestandteile. ganz besonders monoklonale Antikörper oder deren funktionelle Teile.

Die folgenden Figuren sollen die Erfindung näher beschreiben. ohne sie zu beschränken.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt schematisch das allgemeine Prinzip einer Erkennungsspezies, die *in situ* um ein zu erkennendes Substrat erzeugt wird. Die Komplexierungseinheit (Peptid) kann durch eine Trägermatrix bekannt sein. Hierbei bildet sich eine thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert konstituierte Bindungstasche als Komplex mit dem Substrat. Die zu allen B-Einheiten komplementäre Paarungseinheit A ist am Träger fixiert (immobilisiert).

Fig. 2 zeigt schematisch eine Anordnung von immobilisierten Erkennungsstrukturen (Arrays) auf einem festen Träger.

Fig. 3 zeigt schematisch die modulare Erzeugung eines supramolekularen Arrays. Auf dem gleichen Anticodon-Träger werden durch Adressierung mit den selektiven Paarungsregionen unterschiedliche Immunoarrays aufgebaut.

Fig. 4 zeigt schematisch den Aufbau eines Arrays mit 4 Trägerpositionen (Elektroden) und das Meßprinzip.

Fig. 5 zeigt schematisch UV-spektroskopisch und Impedanz-spektroskopisch den Nachweis der Paarung der Anticodon-Codon-Moleküle. Durch Temperaturerniedrigung paaren die Stränge, der Pufferüberstand verarmt, die UV-Extinktion des Überstandes nimmt ab bzw. die Veränderung der Elektrodendoppelschicht wirkt auf die Impedanzmessung.

Fig. 6 zeigt schematisch die Funktionsweise eines adressierten Immunoarrays. Lediglich Elektrode 3 trägt die passende Adresse zu einem Antikörper-Paarungsstrang-Konjugat. Wird das passende Antigen zugegeben, verändert sich die Impedanz an der Elektrode 1 anders als durch bloße Pufferveränderung an den anderen Elektroden.

Fig. 7 zeigt die Abkühlkurven eines temperaturinduzierten UV-Paarungsexperiments mit zwei komplementären p-RNA-Adressen. an die jeweils ein Histidin-Peptid konju-

giert ist. Die Paarung erzeugt eine Erkennungsregion für Nickelionen als Substrat. Das Substrat führt zu einer deutlichen Erhöhung der Umwandlungstemperatur T_m, die ohne die Histidinreste nicht beobachtet wird.

Fig. 8 zeigt schematisch eine einfache Matrix aus zwei aufgedampften Goldelektroden.

Fig. 9 zeigt den direktelektronischen Nachweis eines Antigen-Antikörperkomplexes auf einer Elektrodenposition des Arrays durch Impedanzspektroskopie.

Fig. 10 zeigt einen zusätzlichen Nachweis des Antigen-Antikörperkomplexes auf der adessierten Elektrode mittels Fluoreszens.

Beispiele

Beispiel 1

Synthese eines einen Linker enthaltenden p-RNA-Oligonucleotids mit Linker der Formel 4´ AGGCAIndT 2´:

1.1 Festphasensynthese des Oligonucleotids

A, G, C, T steht für die Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin und Ind bedeutet Aminoethylindol (Indol CH_2-CH_2-NH_2) als Linker in Form einer Nucleobase.

Die vollautomatische Festphasensynthese wurde mit jeweils 15 µmol durchgeführt. Ein Synthesezyklus besteht aus den folgenden Schritten:

(a) Detritylierung: 5 Minuten mit 6% DCA (Dichloressigsäure) in CH_2Cl_2 (79 ml).

(b) Waschen mit CH_2Cl_2 (20 ml), Acetonitril (20 ml) und danach Spülen mit Argon;

(c) Kupplung: Waschen des Harzes mit dem Aktivator (0,5 M Pyridin.HCl in CH_2Cl_2 (0,2 ml) und anschließend 30minütiges Behandeln mit Aktivator (0,76 ml) und Phosphoramidit der entsprechenden Nucleobase (0, 76 ml : 8 eq; 0,1 M in Acetonitril) im Verhältnis 1/1;

(d) Capping: 2-minütiges Behandeln mit 50% Cap A (10,5 ml) und 50% Cap B (10.5 ml) von PerSeptive Biosystems, Inc., Texas, USA (Cap A: THF, Lutidine, Acetanhydrid: Cap B: 1-Methylimidazol. THF, Pyridin);

(e) Oxidation: 1-minütiges Behandeln mit 120 ml Iodlösung (400 mg Jod in 100 ml Acetonitril. 46 ml H_2O und 9,2 ml sym-Collidine); und

(f) Waschen mit Acetonitril (22 ml).

Zur Erleichterung der nachfolgenden HPLC Reinigung der Oligonucleotide wurde die letzte DMT(Dimethoxytrityl)-Gruppe nicht abgespalten. Zum Nachweis der letzten Kupplung mit den modifizierten Phorphoramiditen wurde nach der Synthese mit 1% des Harzes eine Tritylkationabsorption in UV (503 nm) durchgeführt.

1.2 Aufarbeitung des Oligonucleotids:

Die Abspaltung der Allyletherschutzgruppen erfolgte mit einer Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (272mg), Triphenylphosphin (272 mg) und Diethylammoniumhydrogencarbonat in CH_2Cl_2 (15ml) nach 5 Stunden bei RT. Die Glasträger wurden danach mit CH_2Cl_2 (30ml), Aceton (30ml) und Wasser (30ml) gewaschen. Um Palladiumkomplexreste zu entfernen, wurde das Harz mit einer wäßrigen 0,1 M Natriumdiethyldithiocarbamathydratlösung gespült. Die obenerwähnte Waschoperation wurde in einer umgekehrten Reihe noch einmal durchgeführt. Anschließend wurde das Harz am Hochvakuum 10 Minuten getrocknet. Der Abspaltungsschritt vom Glasträger bei gleichzeitiger Debenzoylierung wurde in 24% Hydrazinhydratlösung (6ml) bei 4°C durchgeführt. Nach HPLC-Kontrolle an RP 18 (18-25 Stunden) wurde das Oligonucleotid „Trityl ON" mittels einer aktivierten (Acetonitril, 20 ml) Waters Sep-Pak Cartridge vom Hydrazin befreit. Das Hydrazin wurde mit TEAB, 0,1M (30ml) gewaschen. Das Oligonucleotid wurde dann mit Acetonitril/TEAB, 0.1M (10ml) eluiert. Anschließend wurde mittels HPLC zur Abtrennung von Abbruchsequenzen gereinigt und die DMT-Entschützung (30 ml 80%ig wäßrige Ameisensäure) durchgeführt. Abschließende Entsalzung (über Sep-Pak Kartouche, mit TEAB Puffer 0,1M/Acetonitril: 1'1) lieferte das reine Oligonucleotid.

Beispiel 2

Jodacetylierung von *p*-RNA mit N-(Jodacetyloxy)-succinimid

p-RNA-Sequenz : 4′ AGGCAIndT 2′ M_w = 2266,56 g/mol. hergestellt gemäß Beispiel 1.

1 eq. der *p*-RNA wurde in einer 0,1 molaren Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,4) gelöst (1 ml pro 350 nmol) und mit einer Lösung von N-(Jodacetyloxy)-succinimid in DMSO versetzt (40 µl pro mg). Man dunkelt den Ansatz mit Aluminiumfolie ab und ließ ihn bei Raumtemperatur für 30-90 Minuten stehen.

Der Fortgang der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Die Standardbedingungen waren:
Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser
Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4
Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten
Säulenmaterial : 10 µM LiChrosphere ® 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4 mm
Retentionszeit der Edukte: 18,4 Minuten
Retentionszeit der Produkte in diesem Falle : 23,1 Minuten

Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 oD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um Salz und Reagenz zu entfernen, und eluierte zuerst mit 5 x 1 ml 50:1 Wasser : Acetonitril und anschließend mit 1:1. Das Produkt eluierte in den 1:1-Fraktionen in sehr guter Reinheit. Die Fraktionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingeengt, vereinigt, und wieder eingeengt.

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt.
Massenspektrometrie :
Sequenz : 4′ AGGCAInd($CH_2CH_2NHCOCH_2$-I)T 2′
berechnete Masse : 2434.50 g/mol
gefundene Masse MH_2^{2+}: 1217.9 g/mol = 2433

Beispiel 3

Konjugation von *p*-RNA an ein Peptid der Sequenz $(His)_6$:

Die jodacetylierte *p*-RNA (M_w = 2434,50 g/mol) wurde in einem Puffersystem gelöst (1000µl pro 114 nmol) und dann mit einer Lösung des Peptides in Puffer versetzt (2 moleq. $(His)_6$-Peptid).

Puffersystem : Borax/HCl-Puffer der Firma Riedel-de Haën, pH 8,0, wurde im Verhältnis 1:1 mit einer 10 millimolaren Lösung von EDTA-Dinatriumsalz in Wasser gemischt und auf pH 6,3 mit HCl eingestellt. Man erhielt dadurch eine Lösung, die 5 mM Na_2EDTA enthält.

Man beließ den Ansatz bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Analytik verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz direkt mittels RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingeengt, vereinigt, und wieder eingeengt. Man nahm in Wasser auf und entsalzte. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 oD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um das Salz zu entfernen, und eluierte mit Wasser : Acetonitril 1:1. Die Produkt-Fraktionen wurden eingeengt, vereinigt, und wieder eingeengt.

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt. Sie erreichten 70-95% der Theorie.

HPLC-Analytik:

Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

Säulenmaterial : 10 µM LiChrosphere ® 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4

Retentionszeit des Produktes : 16,9 Minuten

Massenspektrometrie :

Sequenz : 4´ AGGCAInd($CH_2CH_2NHCOCH_2$-$(His)_6$T 2´

berechnete Masse : MH_2^{2+} : 1626,9 g/mol

gefundene Masse MH_2^{2+} : 1626,0 g/mol

Analog wurde die komplementäre Sequenz 4′ Ind($CH_2CH_2NHCOCH_2$-$(His)_6$TGCCT 2′ hergestellt:

berechnete Masse MH_2^{2+}: 1436,2 g/mol
gefundene Masse MH_2^{2+} : 1436,4 g/mol

Analog wurden auch Peptidbibliotheken zur Bildung von Erkennungsregionen an die p-RNA konjugiert.

Im UV-Lösungsexperiment konnte nachgewiesen werden, daß die Wechselwirkung der Histidinuntereinheiten mit einem Substrat (Nickel-Ionen), die Paarungseigenschaften selbst beeinflussen. Eine je 5µM p-RNA-Konjugatlösung in 10mM Tris HCl 150mM ultrarein NaCl zeigte im UV-Paarungsexperiment ein T_m von 32°C, der sich nach Zugabe von 10 Äquivalenten Nickel-Ionen pro Strang um 10° C auf 42° erhöhte. Somit geht der Nachweis, d. h. die Erkennung eines Substrates hier sehr vorteilhaft mit der Adressierung selbst einher; das entspricht auf der Trägermatrix dem Immobilisierungsvorgang.

Beispiel 4

Direktelektronische Detektion einer Antikörper/Antigen-Erkennung auf dem adressierbaren Erkennungssystem

Eine einfache Matrix aus zwei aufgedampften Goldelektroden wurde als Beispiel eines adressierbaren Erkennungssystems verwendet (siehe Fig. 8).

An eine jodacetylierte p-RNA Sequenz wurde eine im Handel erhältliche Thiol-reduzierte Antikörpereinheit (Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA) wie oben beschrieben ankonjugiert.

Die komplementäre p-RNA-Einheit 4'Ind--TAGGCAAT 2′ wurde mittels 100 equivalenten Traut's Reagenz in 1mM wässriger EDTA und Borax Puffer pH 9.5 am Aminolinker Thiol-

aktiviert. nach 6 Stunden reversed-phase-HPL-chomatographisch gereinigt, und über Nacht an einer der beiden frisch mittels UV-licht gereinigten Gold-Elektroden gebunden. Nur diese Elektrode bindet das Antikörper-p-RNA-Konjugat durch Paarung (siehe Fig. 9).

Die Figur zeigt das Impedanz-Signal (ohne weitere Beschaltung; Spektrometer Solarton Instruments 1260 interface; Solarton Instruments SI 1287) des thio-reduzierten Antikörpers, der direkt über Nacht auf eine frisch gereinigte Elektrode der beschriebenen Art gebunden wurde vor und nach einer Antikörper-Antigen-Komplexierung des immobilisierten Antikörpers unter den Pufferbedingungen 1/15 mol/l Na_2HPO_4, KH_2PO_4, pH 7.4 und Raumtemperatur.

Das Erkennungs-Ergebnis konnte im gewählten Fall mittels Fluoreszenzmarker geprüft werden, da das im Handel erhältliche Antigen (eine Human-IgG-F(ab')2-Fraktion Rockland Immunochemicals) Fluorescein-markiert ist (siehe Fig. 10).

Patentansprüche

1. Erkennungssystem enthaltend
(a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
(b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

2. Erkennungssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Paarungssystem einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Erkennungsspezies B über nicht-kovalente Wechselwirkungen gebildet wird.

3. Erkennungssystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-kovalenten Wechselwirkungen ausgewählt sind aus Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelung („Stacking"), Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen.

4. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das molekulare Paarungssystem eine Nucleinsäure und deren Analoga enthält.

5. Erkennungssystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäuren und deren Analoga eine Pentose, vorzugsweise eine Pentopyranose oder Pentofuranose ist.

6. Erkennungssystem nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Pentose ausgewählt ist aus einer Ribose, Arabinose, Lyxose oder Xylose.

7. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure und deren Analoga ausgewählt ist aus Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure(CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen.

8. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleobase der Nucleinsäure oder deren Analoga ausgewählt ist aus Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Adenin, Guanin, Isoguanin, 6-Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Thymidin, Cytosin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Uracil, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin.

9. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäureanaloga ausgewählt sind aus Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguanosin, Ribopyranosylthymidin, Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyl-uracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)ribopyranosyl]-Derivate.

10. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15, vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide ist.

11. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert ist.

12. Erkennungssystem nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente, wie Cellulose, Gerüstproteine.

13. Erkennungssystem nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente

Bindung oder supramolekulare Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezien wie linearkonstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.

14. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, vorzugsweise in Form einer Matrix, immobilisiert ist.

15. Erkennungssystem nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die definierten Stellen des Trägers adressiert sind.

16. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist.

17. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-16 dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B ein Biomolekül ist.

18. Erkennungssystem nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragemente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.

19. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Er-

kennungsspezien B enthält, wodurch verschiedene Erkennungsspezien B an der Bindungskomponente A binden können.

20. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert ist.

21. Erkennungssystem nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß es
(a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens 2+n verschiedenen Bindestellen für mindestens 2+n verschiedene Erkennungsspezien B1, B2 ... Bn und eine weitere von der Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn verschiedene Erkennungsspezies B(n+3), die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und
(b) mindestens (n+3) verschiedene Erkennungsspezien B1, B2 ... B(n+3),
wobei n eine ganze Zahl von 0-20, vorzugsweise 0-10, insbesondere 0-5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.

22. Erkennungssystem nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn aus einer Substanzbibliothek stammt.

23. Erkennungssystem nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktur der Erkennungsspezies B(n+3) bekannt ist.

24. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 19-23, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Erkennungsspezien B dasselbe Substrat S erkennen.

25. Erkennungssystem nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat S ausgewählt ist aus Moleküle, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen, Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandanaloga, oder Peptide, Peptoide, Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-

Fragemente. oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine. Filamentbestandteile. oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside. oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate. oder Monomere wie Heterozyklen, insbesondere Stickstoffheterozyklen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen. vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide. Saccharide, Nucleinsäuren. Ester. Acetale oder Monomere wie Heterocyclen. Lipide. Steroide, oder Angriffsstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelrezeptoren, spannungs-abhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.

26. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-25, dadurch gekennzeichnet. daß es einen Immunoassay darstellt.

27. Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-26, dadurch gekennzeichnet, daß
(a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,
(b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und
(c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A. Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet. daß die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert wird.

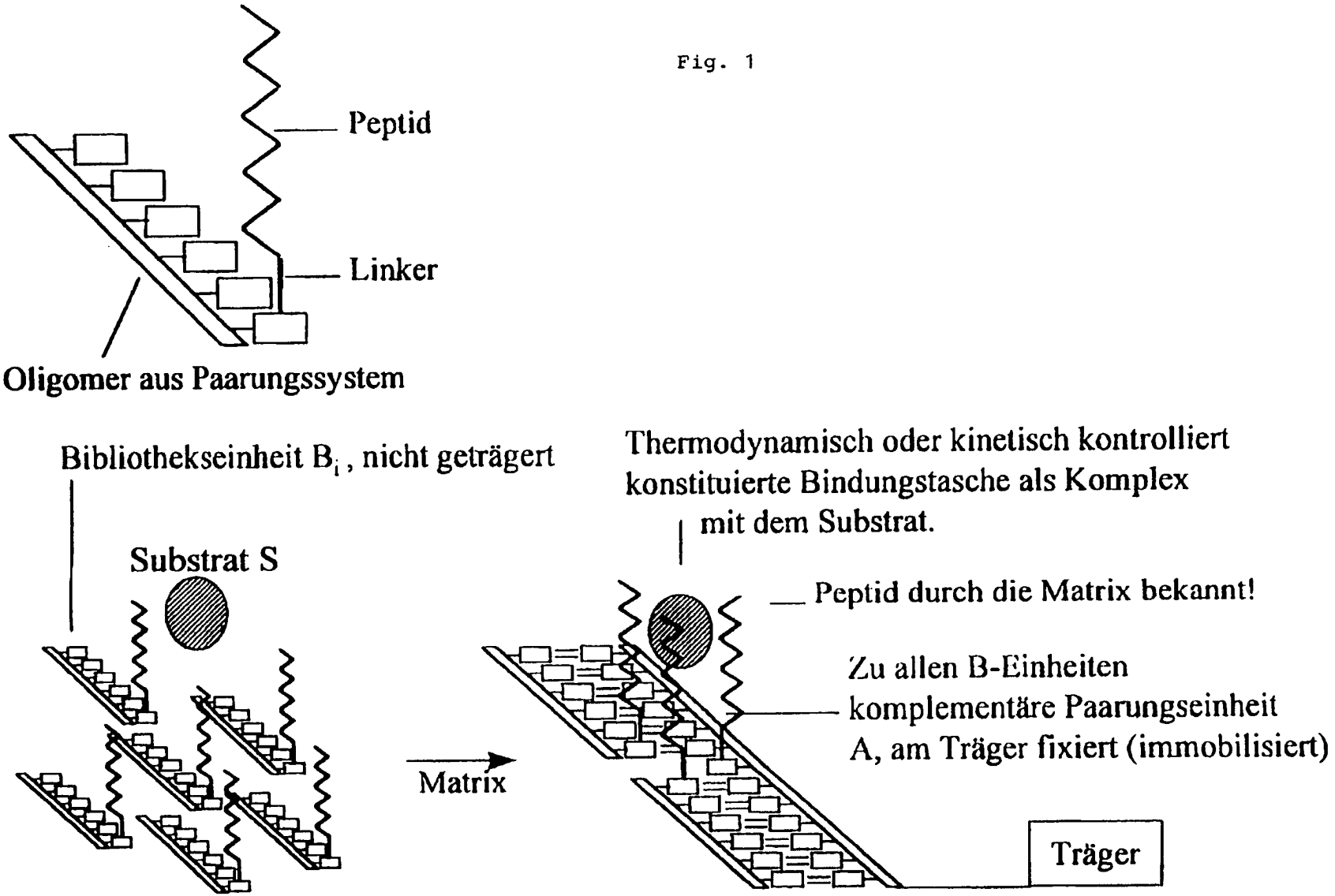
29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28. dadurch gekennzeichnet. daß der Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinnmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen wird. oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse. z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.

32. Verwendung des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-26 zum Auffinden eines Substrates S, zur Diagnose, zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils, insbesondere zum Auffinden, zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Fig. 1


Peptid
Linker
Oligomer aus Paarungssystem
Bibliothekseinheit B_i, nicht geträgert
Substrat S
Matrix
Thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert konstituierte Bindungstasche als Komplex mit dem Substrat.
Peptid durch die Matrix bekannt!
Zu allen B-Einheiten komplementäre Paarungseinheit A, am Träger fixiert (immobilisiert)
Träger

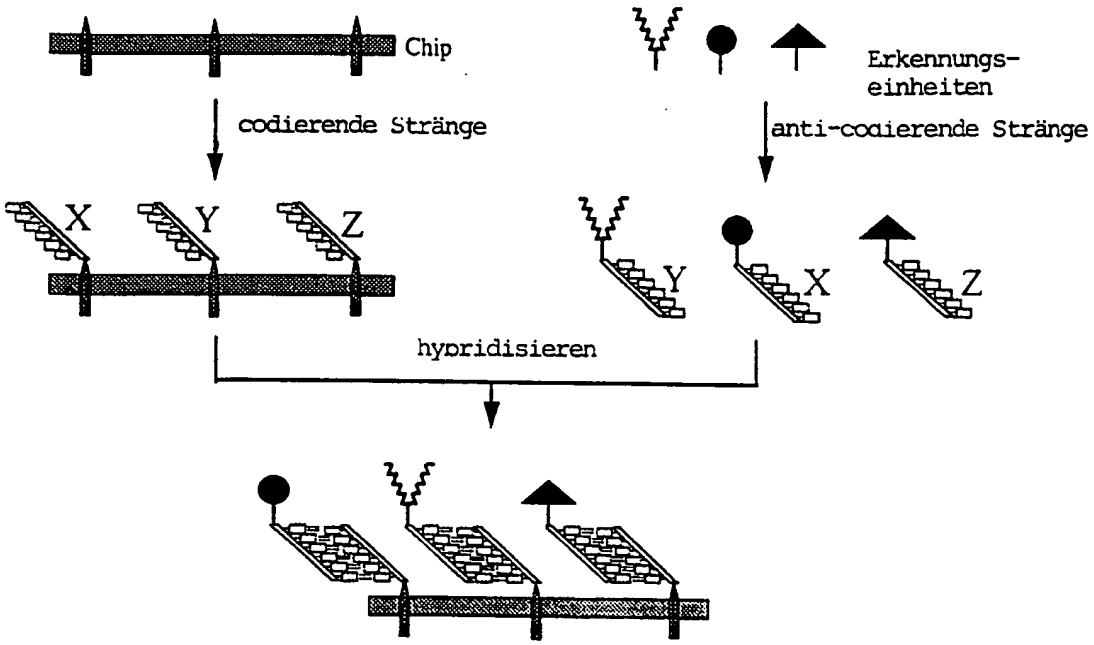

Chip
Erkennungs-
einheiten
codierende Stränge
anti-codierende Stränge
X
Y
Z
Y
X
Z
hybridisieren

Fig. 2

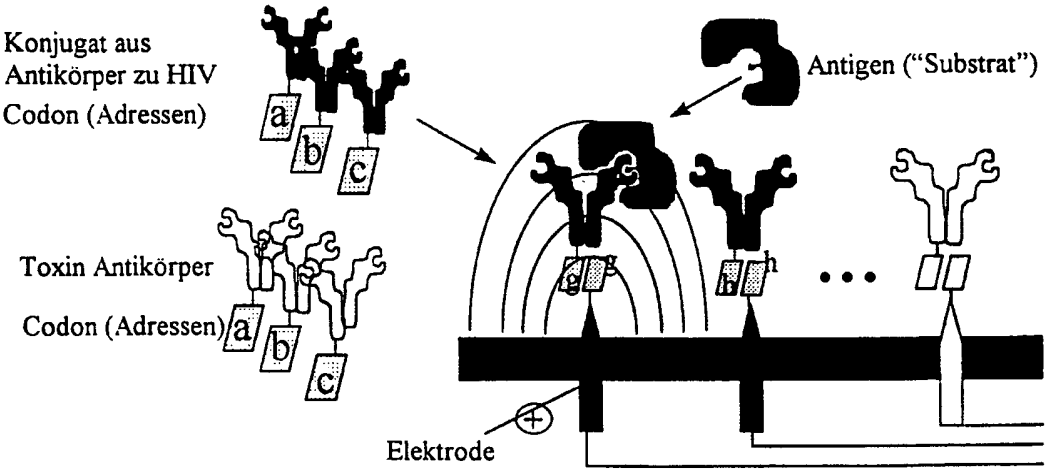
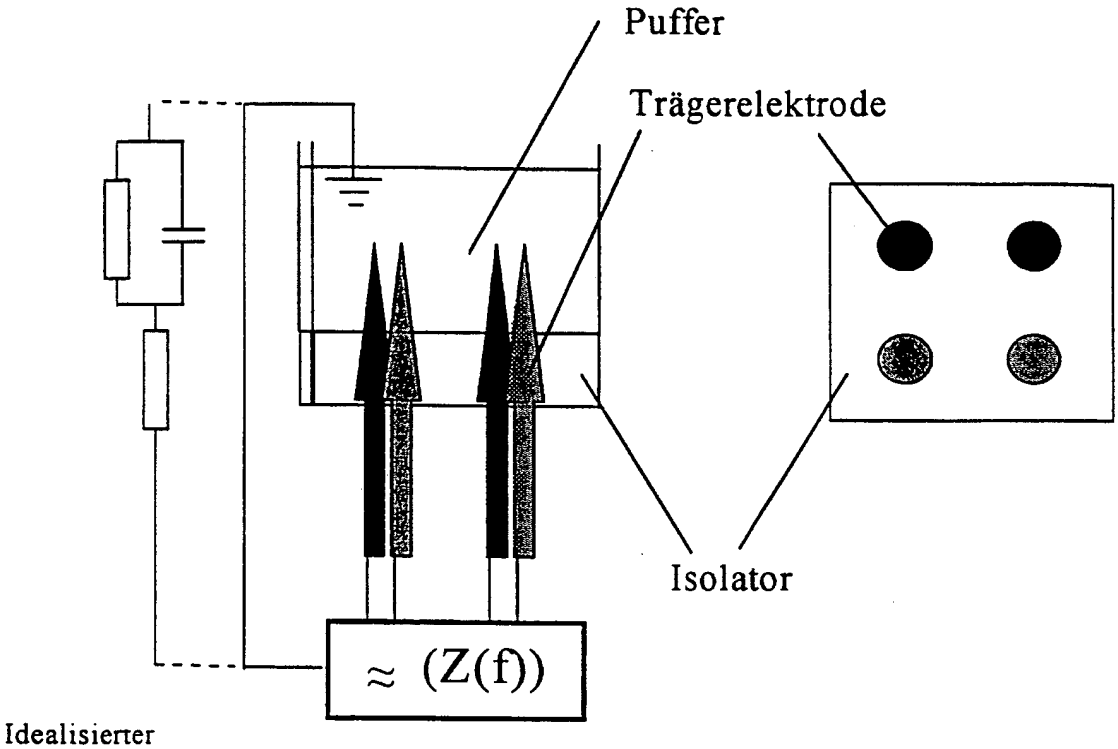

Konjugat aus
Antikörper zu HIV
Codon (Adressen)
a
b
c
Antigen ("Substrat")
Toxin Antikörper
Codon (Adressen)
a
b
c
g
h
Elektrode
+

Fig. 3



Idealisierter Ersatzschaltplan der Versuchsanordnung

Fig. 4

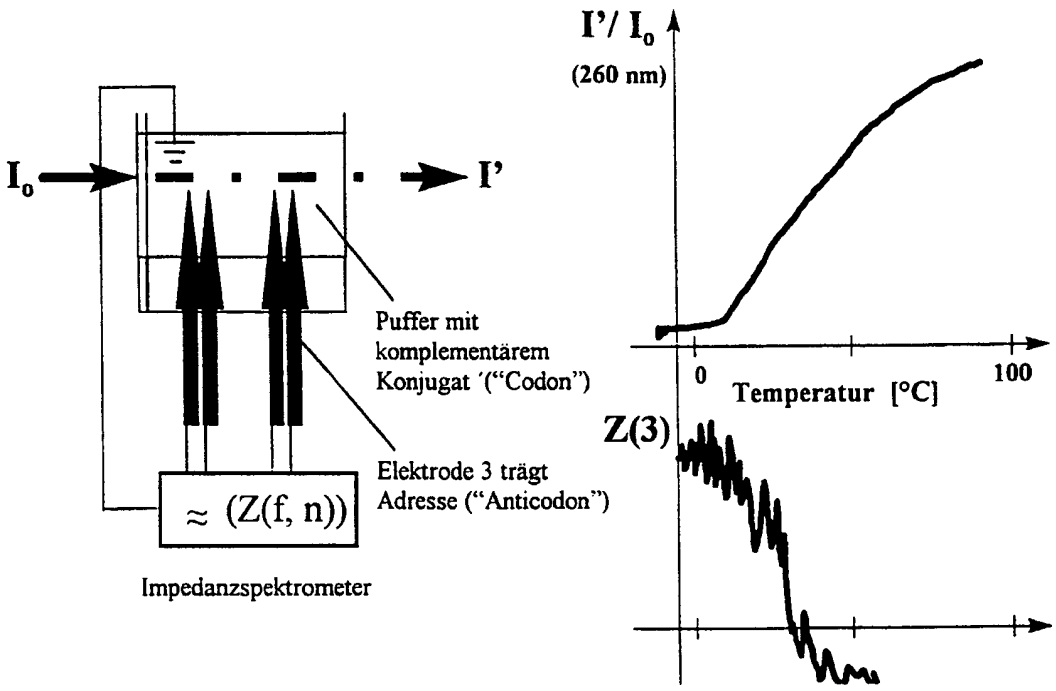

I'/ I0
(260 nm)
I0
I'
Puffer mit
komplementärem
Konjugat ("Codon")
Elektrode 3 trägt
Adresse ("Anticodon")
≈ (Z(f, n))
Impedanzspektrometer
0
100
Temperatur [°C]
Z(3)

Fig. 5

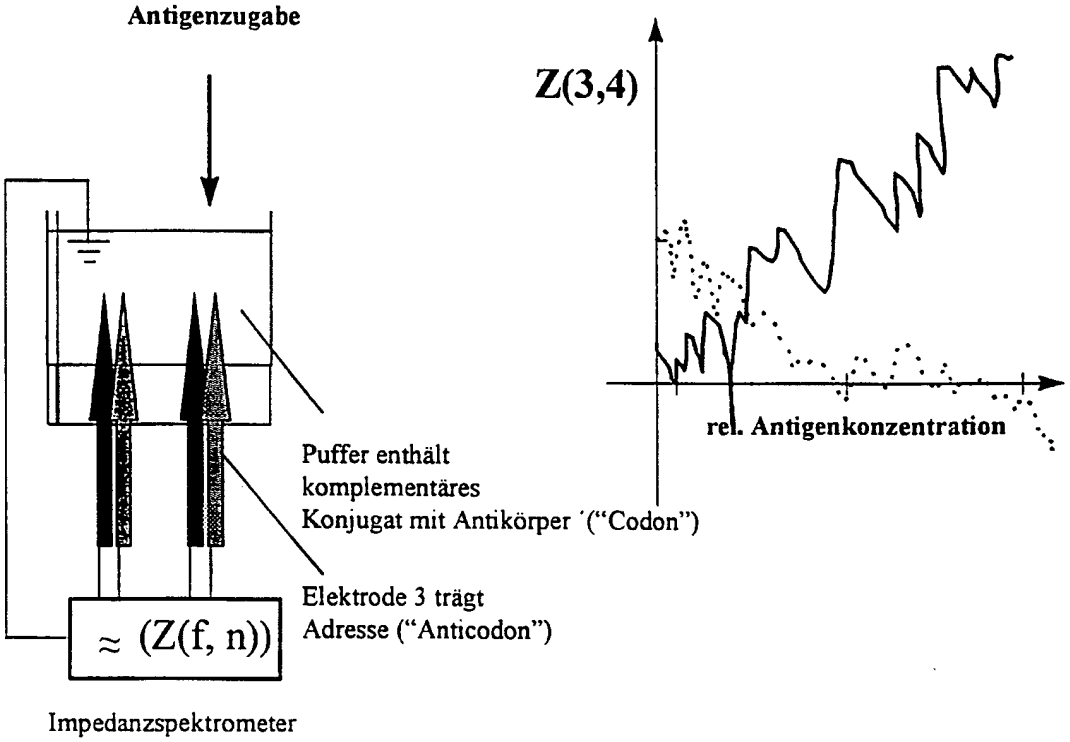

Antigenzugabe
Z(3,4)
rel. Antigenkonzentration
Puffer enthält
komplementäres
Konjugat mit Antikörper ("Codon")
Elektrode 3 trägt
Adresse ("Anticodon")
≈ (Z(f, n))
Impedanzspektrometer

Fig. 6

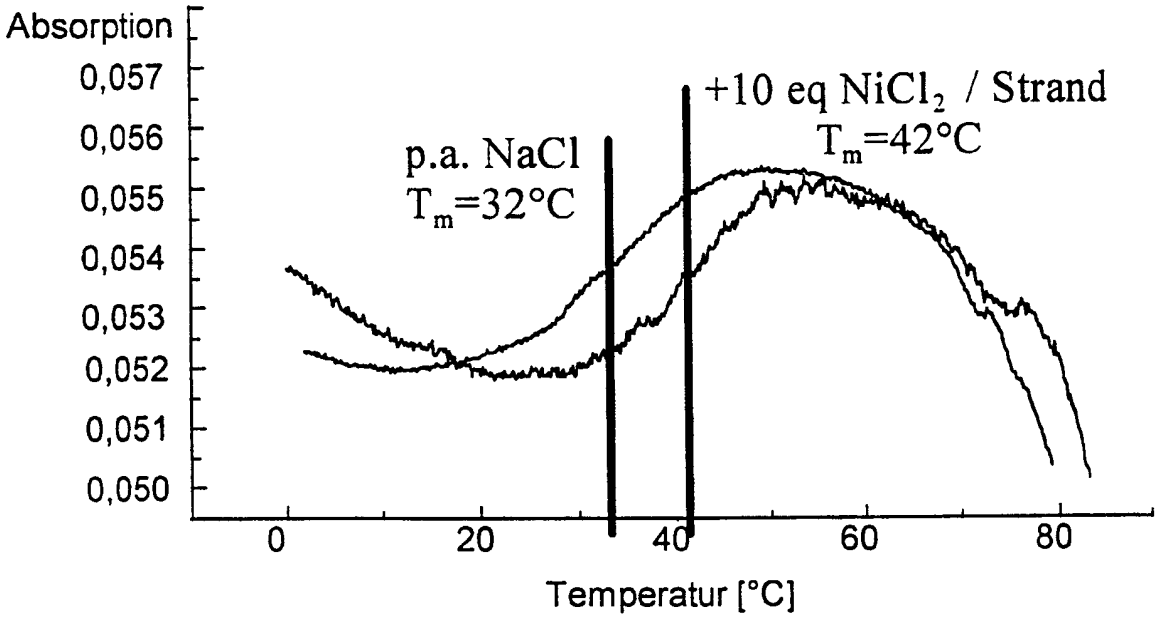

Absorption
0,057
0,056
0,055
0,054
0,053
0,052
0,051
0,050
p.a. NaCl
T_m=32°C
+10 eq $NiCl_2$ / Strand
T_m=42°C
0
20
40
60
80
Temperatur [°C]

Fig. 7

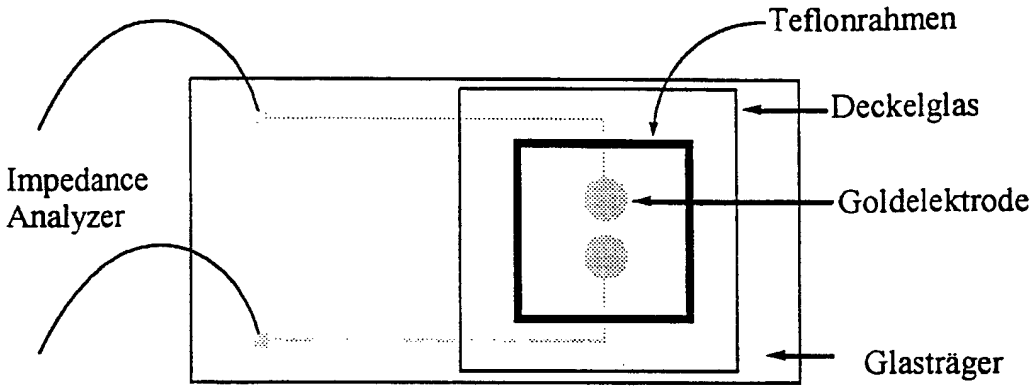

Teflonrahmen
Deckelglas
Goldelektrode
Glasträger
Impedance
Analyzer

Fig. 8

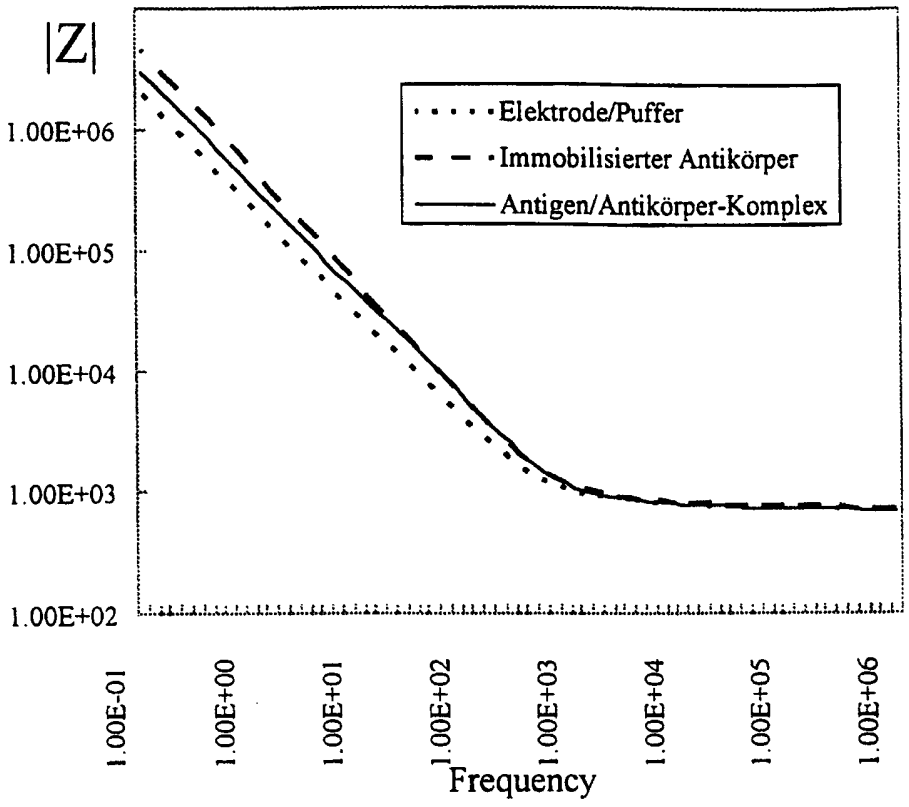

|Z|
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
Elektrode/Puffer
Immobilisierter Antikörper
Antigen/Antikörper-Komplex
1.00E-01
1.00E+00
1.00E+01
1.00E+02
1.00E+03
1.00E+04
1.00E+05
1.00E+06
Frequency

Fig. 9

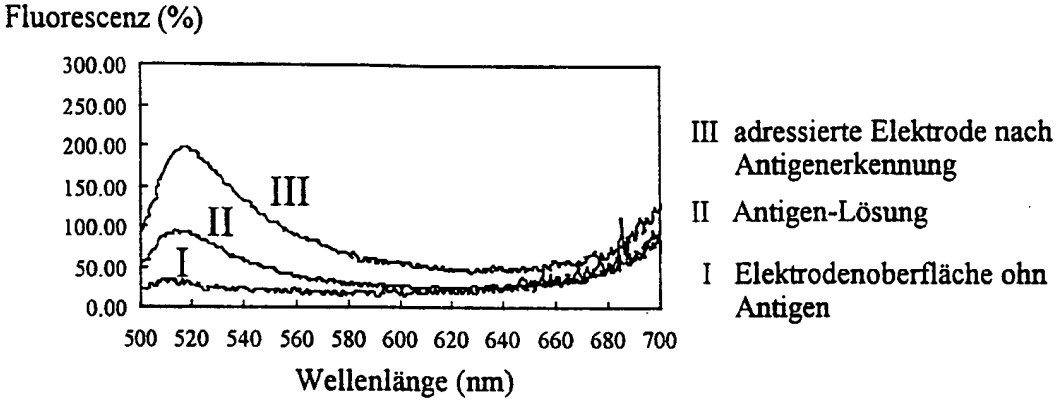

Fluorescenz (%)
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
500 520 540 560 580 600 620 640 660 680 700
Wellenlänge (nm)
III
II
I
III adressierte Elektrode nach Antigenerkennung
II Antigen-Lösung
I Elektrodenoberfläche ohn Antigen

Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. nal Application No
PCT/EP 98/06001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C07K1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 43232 A (ESCHENMOSER ALBERT ;MICULKA CHRISTIAN (DE); HOECHST AG (DE); WINDH) 20 November 1997 see the whole document	1-32
T	WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18 June 1998 see the whole document	1
P,X	WO 97 40385 A (SEUL MICHAEL) 30 October 1997 see figure 10	1-3
Y	WO 96 13522 A (BURSTEIN LAB INC) 9 May 1996 cited in the application see page 8, line 15 - page 16	1-32

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 February 1999	01/03/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr nal Application No
PCT/EP 98/06001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 20242 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;LERNER RICHARD (US); JANDA KIM (US); BRENNE) 14 October 1993 see claims 19-22	1-32
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16 March 1995 see figure 1	1-14, 17-29
X	WO 96 40991 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 19 December 1996 see claim 1	1-3
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 see figure 13B	1-3
X	US 5 188 937 A (SCHULTE THOMAS H ET AL) 23 February 1993 see the whole document	1-3
X	WO 95 04136 A (COR THERAPEUTICS INC ;GIESE NEILL A (US)) 9 February 1995 see the whole document	1-3
A	EP 0 543 550 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 26 May 1993 see page 9, line 9 - line 51; figures 4-7	1-4, 14-17

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern ..al Application No
PCT/EP 98/06001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9743232 A	20-11-1997	DE 19619373 A	20-11-1997
		AU 2895397 A	05-12-1997
WO 9825943 A	18-06-1998	DE 19651560 A	18-06-1998
		AU 5661298 A	03-07-1998
WO 9740385 A	30-10-1997	NONE	
WO 9613522 A	09-05-1996	AU 4197396 A	23-05-1996
		EP 0789715 A	20-08-1997
		JP 10508304 T	18-08-1998
		US 5718915 A	17-02-1998
WO 9320242 A	14-10-1993	US 5573905 A	12-11-1996
		AU 685050 B	15-01-1998
		AU 3944993 A	08-11-1993
		CA 2132103 A	14-10-1993
		EP 0643778 A	22-03-1995
		JP 7505530 T	22-06-1995
		US 5723598 A	03-03-1998
WO 9507289 A	16-03-1995	US 5484909 A	16-01-1996
		EP 0674650 A	04-10-1995
		JP 8503620 T	23-04-1996
		US 5705339 A	06-01-1998
WO 9640991 A	19-12-1996	US 5789163 A	04-08-1998
		AU 5871396 A	30-12-1996
		EP 0832291 A	01-04-1998
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A	20-08-1997
		EP 0880598 A	02-12-1998
US 5188937 A	23-02-1993	NONE	
WO 9504136 A	09-02-1995	AU 7408094 A	28-02-1995
		CA 2166871 A	09-02-1995
		EP 0711341 A	15-05-1996
		JP 9501767 T	18-02-1997
EP 0543550 A	26-05-1993	JP 5322817 A	07-12-1993
		US 5532128 A	02-07-1996
		US 5670322 A	23-09-1997
		US 5653939 A	05-08-1997
		US 5846708 A	08-12-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C07K1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 43232 A (ESCHENMOSER ALBERT ;MICULKA CHRISTIAN (DE); HOECHST AG (DE); WINDH) 20. November 1997 siehe das ganze Dokument ---	1-32
T	WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18. Juni 1998 siehe das ganze Dokument ---	1
P,X	WO 97 40385 A (SEUL MICHAEL) 30. Oktober 1997 siehe Abbildung 10 ---	1-3
Y	WO 96 13522 A (BURSTEIN LAB INC) 9. Mai 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 8, Zeile 15 - Seite 16 ---	1-32

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22. Februar 1999	01/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. ıales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06001

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 93 20242 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;LERNER RICHARD (US); JANDA KIM (US); BRENNE) 14. Oktober 1993 siehe Ansprüche 19-22	1-32
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16. März 1995 siehe Abbildung 1	1-14, 17-29
X	WO 96 40991 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 19. Dezember 1996 siehe Anspruch 1	1-3
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31. Juli 1997 siehe Abbildung 13B	1-3
X	US 5 188 937 A (SCHULTE THOMAS H ET AL) 23. Februar 1993 siehe das ganze Dokument	1-3
X	WO 95 04136 A (COR THERAPEUTICS INC ;GIESE NEILL A (US)) 9. Februar 1995 siehe das ganze Dokument	1-3
A	EP 0 543 550 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 26. Mai 1993 siehe Seite 9, Zeile 9 - Zeile 51; Abbildungen 4-7	1-4, 14-17

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten ıales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9743232	A	20-11-1997	DE	19619373 A	20-11-1997
			AU	2895397 A	05-12-1997
WO 9825943	A	18-06-1998	DE	19651560 A	18-06-1998
			AU	5661298 A	03-07-1998
WO 9740385	A	30-10-1997	KEINE		
WO 9613522	A	09-05-1996	AU	4197396 A	23-05-1996
			EP	0789715 A	20-08-1997
			JP	10508304 T	18-08-1998
			US	5718915 A	17-02-1998
WO 9320242	A	14-10-1993	US	5573905 A	12-11-1996
			AU	685050 B	15-01-1998
			AU	3944993 A	08-11-1993
			CA	2132103 A	14-10-1993
			EP	0643778 A	22-03-1995
			JP	7505530 T	22-06-1995
			US	5723598 A	03-03-1998
WO 9507289	A	16-03-1995	US	5484909 A	16-01-1996
			EP	0674650 A	04-10-1995
			JP	8503620 T	23-04-1996
			US	5705339 A	06-01-1998
WO 9640991	A	19-12-1996	US	5789163 A	04-08-1998
			AU	5871396 A	30-12-1996
			EP	0832291 A	01-04-1998
WO 9727317	A	31-07-1997	AU	2253397 A	20-08-1997
			EP	0880598 A	02-12-1998
US 5188937	A	23-02-1993	KEINE		
WO 9504136	A	09-02-1995	AU	7408094 A	28-02-1995
			CA	2166871 A	09-02-1995
			EP	0711341 A	15-05-1996
			JP	9501767 T	18-02-1997
EP 0543550	A	26-05-1993	JP	5322817 A	07-12-1993
			US	5532128 A	02-07-1996
			US	5670322 A	23-09-1997
			US	5653939 A	05-08-1997
			US	5846708 A	08-12-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)